

**Methodische Untersuchungen
zur Reproduzierbarkeit des
Barbituratnachweises nach Curry**

von

Michael Trautmann

aus

München

1971
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548401_0071

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

**Methodische Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit
des Barbituratnachweises nach Curry**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Michael Trautmann

aus

München

Erlangen 1971

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen—Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. G. Koch

Referent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 1971

Meinem Vater
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung und Problemstellung	Seite	7
B. Quecksilberbarbituratverbindungen, Bildung und chemische Struktur		8
C. Eigene Untersuchungen		10
I. Nachweis von Barbituraten in Blut bzw. Harn nach CURRY		10
1) Prinzip der Methode		10
2) Überprüfung und Abänderung des Verfahrens		11
II. Modifizierter Barbituratnachweis nach CURRY		12
1) Reinigung der Glasgefäße		12
2) Reagentien		13
3) Bereitung der Reagenzlösungen		13
a) Reinigung der Dithizon-Stammlösung nach IWANTSCHIEFF (1958)		13
b) Massanalytische Einstellung der Dithizon-Stammlösung durch direkte extraktive Titration gegen eine eingestellte Silberlösung nach IWANTSCHIEFF (1958)		15
c) Phosphatpuffer		17
d) Quecksilberbicarbonatlösung		17
4) Arbeitsvorschrift zum modifizierten Barbituratnachweis nach CURRY		18

III. Versuche zur Bestimmung des Barbituratgehaltes	
im Harn	Seite 19 a
1) Berechnung des Barbituratgehaltes	19 a
a) für N-methylierte Barbiturate	19 a
b) für nicht N-methylierte Barbiturate	20
2) N-methylierte Barbiturate	21
a) Evipan	21
b) Prominal	23
c) Eunarcon	25
3) nicht N-methylierte Barbiturate	27
a) Luminal	27
b) Phanodorm	29
c) Pentobarbital	31
IV. Bestimmung des Barbituratgehaltes in Blut und Harn	
nach therapeutischer Aufnahme von Luminal	33
D. Diskussion und Zusammenfassung	36
E. Literaturnachweis	38

A. Einleitung und Problemstellung

Die Bestimmung von Barbitursäurederivaten in Blut und Harn gehört zu den häufig anfallenden Aufgaben der forensisch-toxikologischen Praxis.

Unter den verschiedenen Methoden, die sich für den Barbituratnachweis eignen, sind Dünnschichtgromathographie, Gasgromathographie, Infrarotspektroskopie und Massenspektrometrie zu nennen. Viele dieser Verfahren sind, abgesehen von einem zum Teil hohen finanziellen Aufwand, kompliziert und deshalb in Instituten mit spezieller chemisch-toxikologischer Fachrichtung vorbehalten.

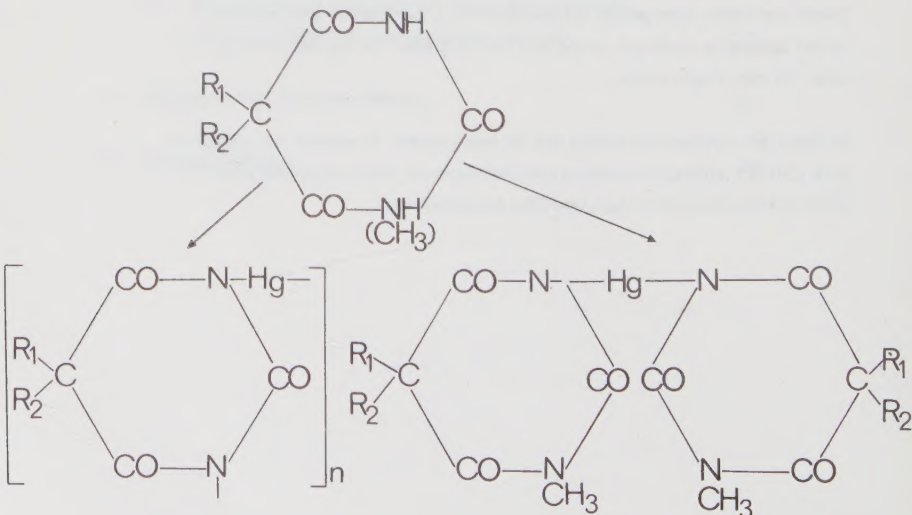
Von CURRY wurde 1963 und 1964 ein einfaches Verfahren zur Bestimmung von Barbituraten im Blut beschrieben.

Dieses Verfahren wäre gerade für das klinische Laboratorium sehr geeignet, da der apparative Aufwand gering und der Zeitbedarf für die Bestimmung unter 10 min. liegen würde.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, in wie weit das Verfahren nach CURRY als Routinemethode zum Nachweis der Barbiturate und seiner Stoffwechselprodukte in Harn und Blut brauchbar ist.

B. Quecksilberbarbituratverbindungen, Bildung und chemische Struktur

Die Fällung der Barbiturate aus wässriger Lösung mit Quecksilber(II)salzen wurde bereits im DAB IV und im Ergänzungsband VI beschrieben. Mit der Aufklärung der entstehenden Quecksilberbarbiturate beschäftigten sich RUPP und MÜLLER (1926) sowie RUPP und POGGENDORF (1931). In den Vorschlägen zu einem Nachtrag zum DAB VI bzw. für ein DAB VII wurde von WINTERFELD, BODENDORF und LOTH (1955) die Reaktion mit Quecksilber(II)nitratlösung zur Unterscheidung der N-methylierten Barbitursäurederivate von den nicht N-methylierten angeführt. POETHKE und FÜRST (1959) stellten fest, dass bei den nicht N-methylierten Barbituraten mit Quecksilber(II)salzen Quecksilberverbindungen entstehen, in denen auf je ein Barbituratmolekül ein Quecksilberatom kommt, wogegen die Quecksilberverbindungen der N-methylierten Barbiturate auf zwei Barbituratmoleküle ein Quecksilberatom besitzen. BJÖRLING, BERGGREN und NYGARD



(1962) setzten die Barbiturate, gelöst in Chloroform, mit wässriger Quecksilber(II)bicarbonatlösung um. Hierbei beobachteten sie, dass die gebildeten Quecksilberbarbiturate bei den nicht N-methylierten Barbituraten polymer sind und dass bei den N-methylierten Barbituraten die gleichen Quecksilberverbindungen entstehen, wie sie von POETHKE und FÜRST beschrieben sind.

Eine Mikromethode zur Bestimmung der Barbiturate über ihre Quecksilberverbindungen wurde 1955 von PFEIL und GOLDBACH vorgeschlagen: Eine barbiturathaltige Lösung wird auf ein Filterpapier getropft und nach dem Trocknen mit Quecksilber(II)nitratlösung befeuchtet. Nach Entfernung des überschüssigen Quecksilberreagenzes durch Waschen mit 0,5 n Schwefelsäure wird das Filterpapier mit Dithizonlösung geschüttelt. Das gebildete Quecksilber dithizonat wird bei 610 nm colorimetrisch bestimmt. BJÖRLING, BERGGREN, WILLMANN-JOHNSON, GRÖNWALL und ZAAR (1958) setzten die Barbiturate in wässriger Lösung bei pH 8 mit Quecksilber(II)-nitrat um und extrahierten die gebildeten Quecksilberbarbituratverbindungen mit einem organischen Lösungsmittel, z.B. Chloroform. Der Quecksilbergehalt wurde mit Dithizon bestimmt. Die Löslichkeit der Barbituratquecksilberkomplexe wurde in dem Verfahren von ZAAR und GRÖNWALL (1961) zur Bestimmung der Barbiturate im Serum herangezogen.

Das Schnellverfahren nach CURRY (1963 a, 1964) zur quantitativen Bestimmung der Barbiturate arbeitet nach dem Prinzip von BJÖRLING und Mitarbeiter.

C. Eigene Untersuchungen

I. Nachweis von Barbituraten in Blut bzw. Harn nach CURRY

1) Prinzip der Methode

Barbiturate werden bei pH 6,95 mit Chloroform aus Blut bzw. Harn extrahiert. Nach Zugabe einer wässrigen Quecksilber(II)bicarbonatlösung bilden sich chloroformlösliche Quecksilberbarbituratverbindungen. Das überschüssige Quecksilberreagenz wird durch mehrmaliges Waschen mit bidest. Wasser entfernt und der Quecksilbergehalt durch Titration mit einer eingestellten Dithizonlösung bestimmt.

CURRY gibt für die quantitative Barbituratbestimmung folgende

ARBEITSVORSCHRIFT an: 1 bzw. 2 ml Blut werden mit 2,5 ml Phosphatpuffer und 15 ml Chloroform 3 min. lang mit Hilfe eines Magnetrührers vermischt. Die wässrige Phase wird mit der Wasserstrahlpumpe entfernt und die organische Phase 2 mal mit 15 ml Wasser gewaschen. Sodann wird der Chloroformphase 1 ml Quecksilberbicarbonatlösung zugefügt und 2 min. gerührt. Anschliessend werden 15 ml Wasser zugegeben und diese wiederum abgesaugt. Nach Zugabe von 3 ml 0,5 n Ammoniak wird unter ständigem Rühren mit Dithizonlösung titriert. Der Endpunkt der Titration ist erreicht, wenn die orange gefärbte organische Phase ins dunkelgrüne umschlägt bzw. die Ammoniakphase gelb wird.

2) Überprüfung und Abänderung des Verfahrens

Zunächst führten wir den Nachweis entsprechend der Vorschrift nach CURRY durch. Hierbei ergaben sich folgende Schwierigkeiten: Der Versuchsaufbau wie ihn CURRY beschreibt, hat sich als wenig praktisch erwiesen, da es nicht möglich ist, aus dem 50 ml Becherglas die wässrige von der organischen Phase so zu trennen, daß einerseits die gesamte wässrige Phase abgesaugt wird, andererseits aber nichts von der organischen Phase verloren geht. Kann z.B. die Quecksilberbicarbonatlösung nicht vollständig abgesaugt werden, kommt es bei der Titration mit Dithizon zu hohen, also unbrauchbaren Werten, da durch die Titration Quecksilber erfasst wird, das nicht mit dem Barbiturat verbunden war.

Bei der Versuchsanordnung von CURRY sind die eingetretenen Verluste, die durch das Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe entstehen nicht genau erfassbar.

Eine weitere Verfälschung der Ergebnisse bringt die Verwendung der Ammoniak-Phase mit sich. Es hat sich bei den Versuchen gezeigt, daß Ammoniak meistens durch Dithizonmetalle (vorwiegend Zink, Blei, Kupfer) verunreinigt ist und sich somit für einen quantitativen Nachweis nicht eignet.

Um die beschriebenen Fehlerquellen auszuschalten, wurde das Verfahren in folgender Weise geändert:

- 1) Es wird ein 25 ml Becherglas verwendet, mit dem das Absaugen der wässrigen Phase erleichtert wird.
- 2) Zur vollständigen Entfernung der wässrigen Phase ist ein 10 ml Meßzylinder (hohe Form) besser geeignet als ein Becherglas.
- 3) Man beginnt immer mit der gleichen Chloroformmenge (10 oder 15 ml) und stellt unmittelbar vor der Titration die Chloroformphase auf 8 bzw. 10 ml ein. Dies lässt sich mit dem Meßzylinder leicht und schnell durchführen. Nach der Titration werden die erhaltenen Werte auf die ursprünglich vorhandenen 10 bzw. 15 ml Chloroform umgerechnet.

4) Die Ammoniakphase wird weggelassen.

II. Modifizierter Barbituratnachweis nach CURRY

Für die Durchführung des Barbituratnachweises über die Quecksilberbarbiturate verwenden wir die auf den folgenden Seiten beschriebenen Geräte, Reagenzien bzw. Reagenzlösungen.

1) Reinigung der Glasgefäße

Wegen der sehr hohen Empfindlichkeit des Dithizons mit Metallionen müssen bezüglich des Arbeitsplatzes, der Geräte und Reagenzien Vorkehrungen getroffen werden, um auch spurenhafte Verunreinigungen beim Arbeiten zu vermeiden.

Es muß zuerst eine gründliche Reinigung der zu verwendenden Geräte durchgeführt werden. Der Gefäßwand haften in mehr oder minder fester Bindung pro cm^2 Glasoberfläche meist mehrere μg Dithizon-Metalle an, die daher aus allen Gefäßen entfernt werden müssen.

IWANTSCHIEFF (1958) reinigt die Gefäße in folgender Weise:

Zur erstmaligen Reinigung werden die üblicherweise gesäuberten Glasgefäße mit halbkonzentrierter warmer Salpetersäure behandelt. Mit etwas Wasser und anschließend mit 0,01 n Ammoniaklösung ausgespült. Sodann werden die Gefäße mehrere Stunden mit konzentrierter Dithizon-Chloroform-Lösung stehen gelassen; zuletzt spült man mit etwas Chloroform und anschließend mit dithizongerechtem Wasser (Aqua bidest.) nach.

2) Reagentien

84,9	mg	Silbernitrat	(AgNO ₃)
0,624	g	di-Natriumhydrogenphosphat	(Na ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O)
0,363	g	Kaliumdihydrogenphosphat	(KH ₂ PO ₄)
0,5	g	Quecksilber(II)chlorid	(HgCl ₂)
0,42	g	Natriumbicarbonat	(NaHCO ₃)
0,1	g	Dithizon	(H ₂ Dz)
2	l	Chloroform	(CHCl ₃)
600	ml	Ammoniak	(NH ₄ OH ca. 0,075n)
50	ml	Schwefelsäure	(H ₂ SO ₄ ca. 1 n)
2	l	Wasser	(H ₂ O bidest.)
1	l	konz. Salpetersäure	

3) Bereitung der Reagenzlösungen**a) Reinigung der Dithizon-Stammlösung nach IWANTSCHJEFF (1958)**

Geräte:	Scheidetrichter	500 ml
	Erlenmeyerkolben	2 00 ml, 500 ml
	Messzylinder	250 ml
	Trichter	Ø 6 cm
	Vorratsflasche	250 ml (Schliff-Flasche, schwarz-lackiertes Hartglas)

Reagentien:	0,1 g	Dithizon	(H ₂ Dz)
	1 l	Chloroform	(CHCl ₃)
	600 ml	Ammoniak	(NH ₄ OH ca. 0,075 n)
	50 ml	Schwefelsäure	(H ₂ SO ₄ ca. 1 n)
	1 l	Wasser	(H ₂ O bidest.)

Etwa 0,1 g Dithizon werden in dem trockenen 500 ml Scheidetrichter mit etwa 150 ml Chloroform 10 min. lang kräftig geschüttelt. Die tiefgrüne Lösung wird mit 100 ml ca. 0,075 n Ammoniak versetzt und etwa 1 min. kräftig geschüttelt. Nach Klärung lässt man die (untere) organische Phase in den 200 ml Erlenmeyerkolben ab. Die wässrige Phase wird in einem 500 ml Kolben gesammelt, die organische Phase in den 500 ml Scheidetrichter zurückgegeben und noch ein bis zweimal in gleicher Weise mit Ammoniak extrahiert und dann verworfen. Die gesammelten wässrigen Phasen werden in den zuvor mit etwas Wasser gespülten 500 ml Scheidetrichter überführt, zwei bis dreimal mit etwa 2 ml reinem Chloroform nachgespült, mit etwa 200 ml Chloroform versetzt, mit 10 ml Schwefelsäure angesäuert und etwa 1 min. lang kräftig geschüttelt.

Durch das Ansäuern wird das bei pH<7 wasserunlösliche Dithizon frei und von der organischen Phase mit grüner Farbe aufgenommen.



(w = wässrige Phase, o = organische Phase)

Nach einigen Minuten hat sich die organische Phase abgesetzt und kann in den 200 ml Erlenmeyerkolben abgelassen werden, die wässrige Phase wird verworfen.

Die Überführung des Dithizons aus Chloroform in Ammoniak und wieder zurück wiederholt man so oft, bis das Ausschütteln mit Ammoniak eine praktisch farblose, organische Phase hinterlässt. Bei der Reinigung des Dithizons stellten wir fest, dass nach zwei- bis dreimaliger Wiederholung die organische Phase zwar nicht farblos wird, aber dennoch die Reinigung der Lösung ausreichend ist.

Die wässrige Ammonium-Dithizon-Lösung wird nun mit 100 bis 200 ml Chloroform versetzt, mit 15 ml Schwefelsäure angesäuert, etwa eine min. lang kräftig geschüttelt und in den zuvor ausgespülten 200 ml Erlenmeyerkolben abgelassen. Die so gereinigte Stammlösung (organische Phase) wird zum Schluss in den ausgespülten 500 ml Scheidetrichter eine min. lang mit 100 ml Wasser durchgeschüttelt, in die Vorratsflasche (schwarzlackiertes Hartglas) gebracht und mit 10 ml Wasser, sowie 1 ml Schwefelsäure überschüttet.

- b) Massanalytische Einstellung der Dithizon-Stammlösung durch direkte extraktive Titration gegen eine eingestellte Silberlösung (nach IWANTSCHIEFF 1968)

Geräte:	Pipette	10 ml
	2 Büretten	50/0,1 ml
	Scheidetrichter	150 ml
	Messkolben	250 ml
	Erlenmeyerkolben	50 ml

Reagentien: Dithizon-Stammlösung (s.S. 13)
 50 μ in AgNO_3 -Eichlösung (84,9 mg AgNO_3 in 1 l H_2O
 gelöst. 10 ml dieser Lösung
 mit 0,1 n HNO_3 auf 100 ml
 aufgefüllt.)
 Chloroform
 Wasser

10 ml Dithizon-Stammlösung werden mit Chloroform auf 250 ml aufgefüllt und in eine Bürette gebracht. In den Scheidetrichter kommen 5 ml AgNO_3 -Eichlösung und 5 ml Wasser. Sodann wird extraktiv mit der verdünnten Dithizonlösung titriert, bis der letzte Tropfen beim Schütteln nicht mehr rein gelb wird. Der Verbrauch der verdünnten Dithizonlösung wird auf 0,05 ml genau abgelesen und ihre Stärke in μ g berechnet. Durch weiteres Verdünnen mit reinem Solvens bzw. definierter Zugabe von Stammlösung kann man die Lösung auf eine gewünschte Stärke bringen.

Berechnung:

1 ml 50 μ m AgNO_3 -Eichlösung enthält 5,394 μ g Ag^+ .

Dithizon setzt sich mit Ag^+ nach folgender Gleichung um:



Nach Umrechnung gilt:

$$5,394 \text{ g Ag}^+ \equiv 12,81 \mu\text{g H}_2\text{Dz}$$

Der Dithizongehalt der Titrationslösung kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\mu\text{g Dz/ml} = \frac{a \times 12,81}{b}$$

a = ml AgNO_3 -Eichlösung

b = ml der verbrauchten Dithizonlösung

c) Phosphatpuffer (pH 6,95)

Es werden 0,624 g di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$) und 0,363 g Kaliumdihydrogenphosphat in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

d) Quecksilberbicarbonatlösung ($200 \mu\text{g Hg/ml}$) nach CURRY

0,5 g Quecksilber(II)chlorid werden in 50 ml bidest. Wasser aufgelöst. Dazu kommen 3 Tropfen konzentrierte Salpetersäure. 1 ml dieser Lösung wird mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt, 0,42 g Natriumbicarbonat dazugegeben und gut durchgeschüttelt.

4) Arbeitsvorschrift zum modifizierten Barbituratnachweis nach CURRY

Geräte:	Magnetrührgerät (Rühromag)	
	Wasserstrahlpumpe	
	Glasabsaugrohr mit seitlicher Öffnung	(s. Abb. 1)
	Becherglas	25 ml
	Messzylinder	10 ml
	Bürette	25 ml
	Pipette	10 bzw. 15 ml
	Pipette	5 ml
	Pipette	2 ml
	Pipette	1 ml

Reagentien:	Chloroform	
	Phosphatpuffer	(pH 6,95)
	Quecksilberbicarbonatlösung	
	Dithizonlösung	
	Wasser(bidest)	

Arbeitsweise:

In ein 25 ml Becherglas werden zu 2 ml Blut bzw. Harn 10 ml Chloroform und 2,5 ml Phosphatpuffer (pH 6,95) gegeben. Nach 3 min. langem Rühren wird die obere wässrige Phase mit Hilfe des Saugrohres und der Wasserstrahlpumpe entfernt. Die untere Chloroformphase wird sodann 2 mal mit 15 ml bidest. Wasser gewaschen, wobei nach dem 2. Waschvorgang zur Entfernung der wässrigen Phase der Messzylinder (hohe Form) verwendet. Die organische untere Phase wird in das Becherglas zurückgegeben und mit 1 ml Quecksilber(II)bicarbonatlösung 2 min. lang gerührt. Hierbei erfolgt die Bildung der Quecksilberbarbituratver-

bindungen. Zur Entfernung des überschüssigen Quecksilberreagenzes wäscht man 2 mal mit 15 ml bidest. Wasser. Die vollständige Beseitigung der (oberen) wässrigen Phase und die Einstellung der Chloroformlösung auf 8 ml wird im Messzylinder durchgeführt. Die mehrmalige Reinigung des Becherglases mit bidest. Wasser darf nicht vergessen werden, um auch hier Spuren des Quecksilberreagenzes zu beseitigen. Nun wird unter ständigem Rühren solange Dithizonlösung aus einer Bürette zugegeben, bis die Farbe von gelb-orange nach blau-grün umschlägt. Der Verbrauch der Titrationslösung wird auf 0,05 ml genau abgelesen.

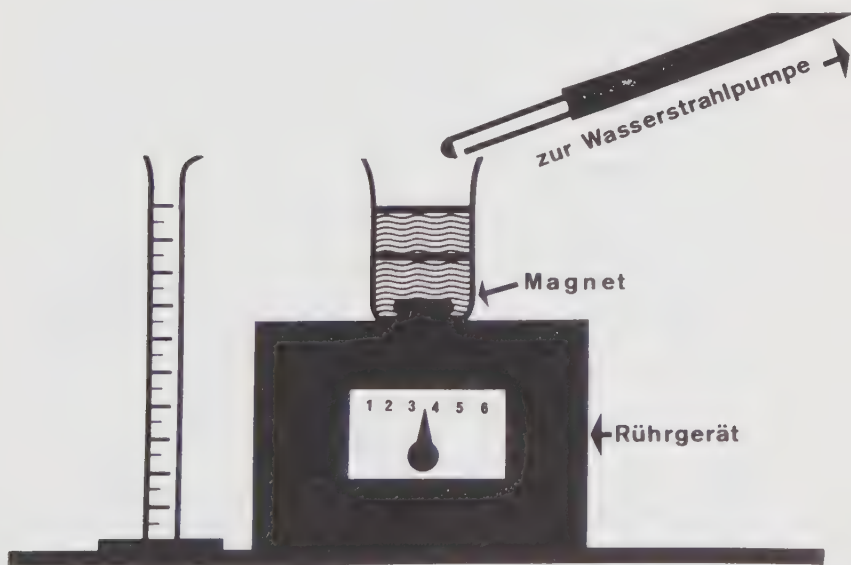


Abb. 1 Geräte für den Nachweis.

III. Versuche zur Bestimmung des Barbituratgehaltes im Harn

Die Versuche wurden in der Weise durchgeführt, dass zu Leerharn N-methylierte und nicht N-methylierte Barbiturate zugefügt wurden, so dass der Barbituratgehalt im Harn zwischen 0,5 und 4 mg% lag.

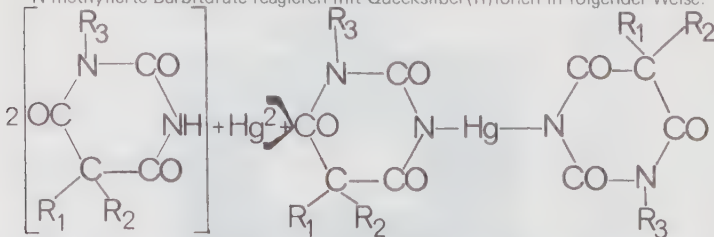
1) Berechnung des Barbituratgehaltes

Barbiturate reagieren mit Quecksilber(II)ionen unter Bildung von Barbiturquecksilberkomplexen, wobei bei den N-methylierten Verbindungen das Verhältnis Barbiturat zu Quecksilber 2 : 1 und bei den nicht N-methylierten 1 : 1 ist. (s.a.S.8)

Danach würden sich für die quantitativen Bestimmungen, je nach dem ob ein N-methyliertes oder nicht N-methyliertes Barbiturat vorliegt, für die Berechnung unterschiedliche Formen ergeben.

a) für N-methylierte Barbiturate

N-methylierte Barbiturate reagieren mit Quecksilber(II)ionen in folgender Weise:



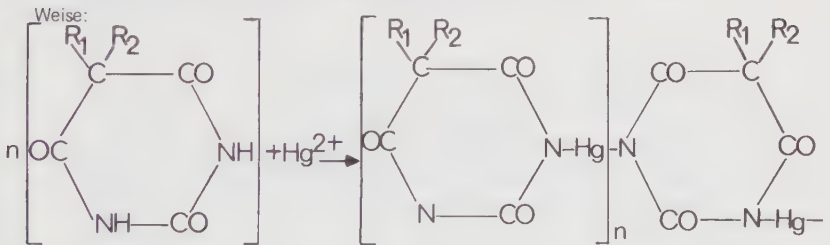
Danach errechnet sich bei Einsatz von 2 ml Harn bzw. Blut für die N-methylierten Barbiturate ein Barbituratgehalt in mg% von

$$\frac{a \times b \times c \times e}{20 \times d \times f}$$

- a = Verbrauch der Dithizonlösung in ml
 b = Molekulargewicht des Barbiturats
 c = g Dithizon pro ml Titrationslösung
 d = Molekulargewicht des Dithizons
 e = zur Extraktion verwendete Chloroformmenge
 f = vor Titration reduzierte Chloroformmenge

b) für nicht N-methylierte Barbiturate

Nicht N-methylierte Barbiturate reagieren mit Quecksilber(II)ionen in folgender

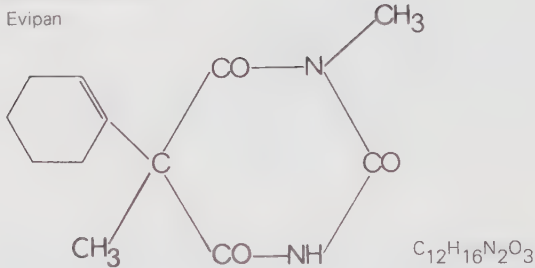


Danach ergibt sich bei Einsatz von 2 ml Harn bzw. Blut für die nicht N-methylierten Barbiturate ein Barbituratgehalt in mg% von

$$\frac{a \times b \times c \times e}{40 \times d \times f}$$

2) N-methylierte Barbiturate

a) Evipan



5-(1,2-Cyclohexenyl)-5-methyl-N-methylbarbitursäure

Zu verschiedenen Leerharnproben wurde Evipan-Natrium zugesetzt, so dass die Harnproben 0,5; 1; 2; 3; 4 mg% Evipan-Natrium enthielten. Von jeder Harnprobe wurden 7 Bestimmungen durchgeführt. In Tab. 1 sind die erhaltenen Titrationswerte ersichtlich.

Versuchs-Nr.	0,5 mg%	1 mg%	2 mg%	3 mg%	4 mg%
1	0,20	0,40	0,60	1,05	1,35
2	0,25	0,35	0,60	0,95	1,35
3	0,15	0,40	0,75	1,05	1,45
4	0,35	0,45	0,70	0,90	1,40
5	0,20	0,40	0,65	1,10	1,40
6	0,25	0,35	0,70	1,05	1,45
7	0,25	0,35	0,60	1,10	1,45
Mittelwerte	0,23	0,39	0,66	1,03	1,40

Tab. 1: Verbraachte Dithizonlösung in ml (1 ml $\hat{=}$ 37,4 μ g Dithizon) bei verschiedenen Barbituratkonzentrationen

Der Evipannatriumgehalt ergibt sich aus der Formel auf Seite 19 a, wobei

b = Molekulargewicht des Evipannatrium = 258,3 und

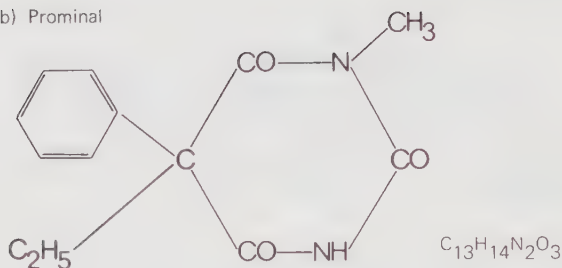
d = Molekulargewicht des Dithizons = 256,3 ist.

In der nachfolgenden Tab. 2 sind die wiedergefundenen Evipanmengen zusammengestellt.

Barbituratkonzentration im Harn in mg%	Gefundene Barbiturat- konzentration in mg%	Ausbeute in %
0,5	0,65	130
1	1,10	110
2	1,87	93,5
3	2,91	97
4	3,96	99

Tab. 2: Gefundene Barbituratkonzentrationen und Ausbeute

b) Prominal



1-Methyl-5-phenyl-5-äthylbarbitursäure

Zu verschiedenen Leerharnproben wurde Prominal zugesetzt, so dass die Harnproben 0,5; 1; 2; 3; 4 mg% Prominal enthielten. Von jeder Harnprobe wurden 7 Bestimmungen durchgeführt. In Tab. 3 sind die erhaltenen Titrationswerte ersichtlich.

Versuchs-Nr.	0,5 mg%	1 mg%	2 mg%	3 mg%	4 mg%
1	0,85	1,40	3,30	5,00	7,55
2	0,90	1,65	3,50	5,00	7,00
3	1,00	1,50	3,15	4,40	6,85
4	0,90	1,60	3,40	5,00	7,25
5	1,00	1,70	3,55	4,90	6,95
6	1,00	1,65	3,50	4,60	7,10
7	0,95	1,65	3,35	5,20	6,90
Mittelwerte	0,94	1,59	3,39	4,87	7,09

Tab. 3: Verbrauchte Dithizonlösung in ml ($1 \text{ ml} \triangleq 9,56 \mu\text{g}$ Dithizon) bei verschiedenen Barbituratkonzentrationen

Der Prominalgehalt ergibt sich aus der Formel auf Seite 19 a, wobei

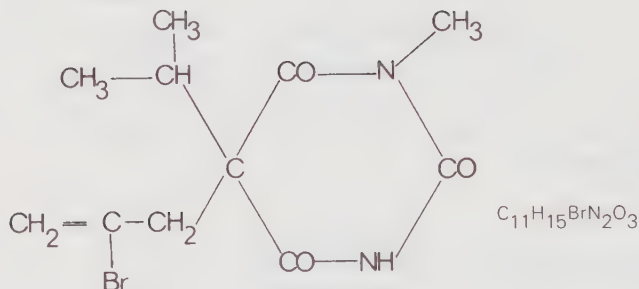
$$\begin{aligned} b &= \text{Molekulargewicht des Prominal} = 246,3 \text{ und} \\ d &= \text{Molekulargewicht des Dithizons} = 256,3 \text{ ist.} \end{aligned}$$

In der nachfolgenden Tab. 4 sind die wiedergefundenen Prominalmengen zusammengestellt.

Barbituratkonzentration im Harn in mg%	Gefundene Barbiturat- konzentration in mg%	Ausbeute in %
0,5	0,54	108
1	0,91	91
2	1,95	97,5
3	2,80	93,33
4	4,07	101,75

Tab. 4: Gefundene Barbituratkonzentrationen und Ausbeute

c) Eunarcon



5-Isopropyl-5-(β-brom-allyl)-1-methylbarbitursäure

Zu verschiedenen Leerharnproben wurde Eunarcon zugesetzt, so dass die Harnproben 0,5; 1; 2; 3; 4 mg% Eunarcon enthielten. Von jeder Harnprobe wurden 7 Bestimmungen durchgeführt. In Tab. 5 sind die erhaltenen Titrationswerte ersichtlich.

Versuchs-Nr.	0,5 mg%	1 mg%	2 mg%	3 mg%	4 mg%
1	0,70	1,25	2,10	3,00	3,40
2	0,70	1,10	2,25	2,90	4,00
3	0,75	1,15	2,40	2,80	3,30
4	0,75	1,05	2,25	2,75	3,85
5	0,75	1,15	2,30	2,90	3,60
6	0,75	1,15	2,25	2,85	3,60
7	0,70	1,20	2,45	3,00	3,50
Mittelwerte	0,73	1,15	2,95	2,89	3,61

Tab. 5: Verbrauchte Dithizonlösung in ml (1 ml $\triangleq$ 9,56 μ g Dithizon) bei verschiedenen Barbituratkonzentrationen

Der Eunarcongehalt ergibt sich aus der Formel auf Seite 19 a, wobei

b = Molekulargewicht des Eunarcon = 303,2 und

d = Molekulargewicht des Dithizons = 256,3 ist.

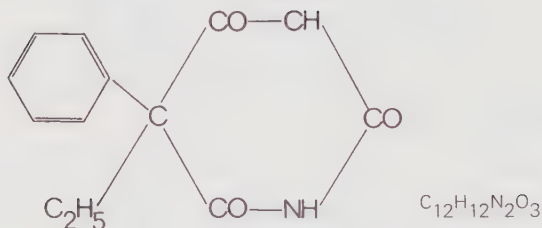
In der nachfolgenden Tab. 6 sind die wiedergefundenen Eunarconmengen zusammengestellt.

Barbituratkonzentration im Harn in mg%	Gefundene Barbiturat- konzentration in mg%	Ausbeute in %
0,5	0,52	104
1	0,81	81
2	1,62	81
3	2,04	68
4	2,55	63,75

Tab. 6: Gefundene Barbituratkonzentration und Ausbeute

3) Nicht N-methylierte Barbiturate

a) Luminal-Natrium



5-Phenyl-5-äthylbarbitursäure

Zu verschiedenen Leerharnproben wurde Luminal-Natrium zugesetzt, so dass die Harnproben 0,5; 1; 2; 3; 4 mg% Luminal-Natrium enthielten. Von jeder Harnprobe wurden 7 Bestimmungen durchgeführt. In Tab. 7 sind die erhaltenen Titrationswerte ersichtlich.

Versuchs-Nr.	0,5 mg%	1 mg%	2 mg%	3 mg%	4 mg%
1	0,80	1,70	5,15	6,55	7,15
2	0,70	2,05	3,60	6,00	6,45
3	0,80	1,55	4,25	5,80	6,85
4	0,65	1,95	3,40	5,75	8,10
5	0,80	1,70	3,90	5,45	7,10
6	0,75	1,60	3,25	6,15	8,25
7	0,80	1,65	3,75	6,60	7,35
Mittelwerte	0,76	1,74	3,90	6,04	7,32

Tab. 7: Verbrauchte Dithizonlösung in ml (1 ml $\hat{=}$ 14,96 μ g Dithizon bei verschiedenen Barbituratkonzentrationen)

Der Luminalnatriumverbrauch ergibt sich aus der Formel auf Seite 20, wobei

b = Molekulargewicht des Luminal-Na = 254,2 und

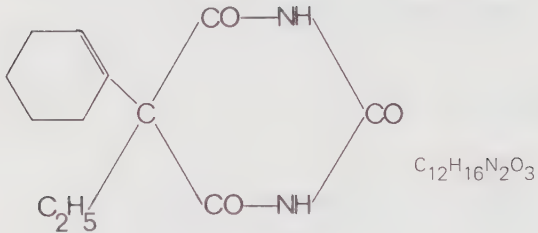
d = Molekulargewicht des Dithizons = 256,3 ist.

In der nachfolgenden Tab. 8 sind die wiedergefundenen Luminalnatriummengen zusammengestellt.

Barbituratkonzentration im Harn in mg%	Gefundene Barbiturat- konzentration in mg%	Ausbeute in %
0,5	0,35	70
1	0,81	81
2	1,81	90,5
3	2,80	93,33
4	3,40	85

Tab. 8: Gefundene Barbituratkonzentrationen und Ausbeute

b). Phanodorm Calcium

5-($\Delta^{1,2}$ -cyclohexenyl)-5-äthylbarbitursäure

Zu verschiedenen Leerharnproben wurde Phanodorm Calcium zugesetzt, so dass die Harnproben 0,5; 1; 2; 3; 4 mg% Phanodorm Calcium enthielten. Von jeder Harnprobe wurden 7 Bestimmungen durchgeführt. In Tab. 9 sind die erhaltenen Titrationswerte ersichtlich.

Versuchs-Nr.	0,5 mg%	1 mg%	2 mg%	3 mg%	4 mg%
1	0,20	0,25	0,50	0,60	2,10
2	0,10	0,30	0,55	1,00	3,85
3	0,20	0,25	0,55	0,65	1,95
4	0,15	0,25	0,55	0,60	1,35
5	0,15	0,30	0,45	0,75	0,75
6	0,15	0,25	0,50	1,00	1,30
7	0,15	0,25	0,60	0,60	0,80
Mittelwerte	0,16	0,26	0,53	0,74	1,73

Tab. 9: Verbrauchte Dithizonlösung in ml (1 ml Δ 37,4 μ g Dithizon)
bei verschiedenen Barbituratkonzentrationen

Der Phanodorm-Calciumverbrauch ergibt sich aus der Formel auf Seite 20, wobei

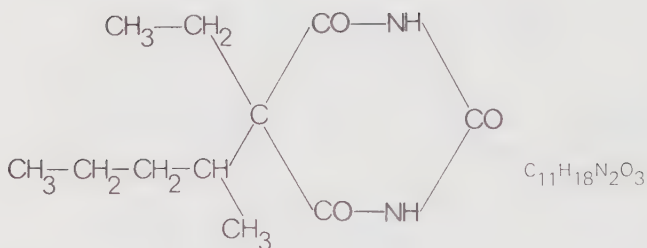
$$\begin{aligned} b &= \text{Molekulargewicht des Phanodorm-Ca} = 276,3 \quad \text{und} \\ d &= \text{Molekulargewicht des Dithizons} = 256,3 \quad \text{ist.} \end{aligned}$$

In der nachfolgenden Tab. 10 sind die wiedergefundenen Phanodorm-Calciummengen zusammengestellt.

Barbituratkonzentration im Harn in mg%	Gefundene Barbiturat- konzentration in mg%	Ausbeute in %
0,5	0,20	40
1	0,33	33
2	0,67	33,5
3	0,93	31
4	2,18	54,5

Tab. 10: Gefundene Barbituratkonzentrationen und Ausbeute

c) Pentobarbital



5-Äthyl-5-pentyl (2') barbitursäure

Zu verschiedenen Lochharnproben wurde Pentobarbital zugesetzt, so dass die Harnproben 0,5; 1; 2; 3; 4 mg% Pentobarbital enthielten. Von jeder Harnprobe wurden 7 Bestimmungen durchgeführt. In Tab. 11 sind die erhaltenen Titrationswerte ersichtlich.

Versuchs-Nr.	0,5 mg%	1 mg%	2 mg%	3 mg%	4 mg%
1	1,95	3,15	6,40	11,10	14,25
2	1,90	3,40	6,65	10,80	14,40
3	1,75	3,05	7,00	10,80	14,30
4	1,75	3,30	6,80	10,20	13,90
5	1,75	3,55	7,15	9,95	13,90
6	1,80	3,45	8,20	10,85	14,10
7	1,75	3,50	7,15	10,60	16,10
Mittelwerte	1,81	3,34	7,05	10,61	14,42

Tab. 11: Verbrauchte Dithizonlösung in ml (1 ml Δ 9,56 μ g Dithizon) bei verschiedenen Barbituratkonzentrationen.

Der Pentobarbitalverbrauch ergibt sich aus der Formel auf Seite 20, wobei

b = Molekulargewicht des Pentobarbitals = 226,3 und

d = Molekulargewicht des Dithizons = 256,3 ist.

In der nachfolgenden Tab. 12 sind die wiedergefundenen Pentobarbitalmengen zusammengestellt.

Barbituratkonzentration im Harn in mg%	Gefundene Barbiturat- konzentration in mg%	Ausbeute in %
0,5	0,48	96
1	0,88	88
2	1,86	93
3	2,80	93,33
4	3,81	95,25

Tab. 12: Gefundene Barbituratkonzentrationen und Ausbeute

IV. Bestimmung des Barbituratgehaltes in Blut und Harn nach therapeutischer Aufnahme von Luminal

Da sich bei unseren beschriebenen Untersuchungen gezeigt hat, dass der modifizierte Barbituratnachweis nach CURRY geeignet ist, den Barbituratgehalt im Harn zu bestimmen, wurde in einem Selbstversuch eine therapeutische Luminalmenge aufgenommen.

Es wurden um 9.20 Uhr 400 mg reines Luminal (Molekulargewicht 232,2) oral aufgenommen. Letzte Nahrungsaufnahme war am Vorabend. Erste Nahrungsaufnahme erfolgte gegen 13.00 Uhr. Die erste Harn- und Blutentnahme war um 10.20 Uhr. In den folgenden 24 Stunden wurden 8 Harnproben gesammelt. In den folgenden 5 Stunden wurden 4 Blutproben entnommen.

Die Barbituratwerte in Harn- und Blutproben sind in Tab. 13 bzw. 14 zusammengestellt.

Uhrzeit der Entnahme	Gesamtharn- menge in ml	Titrationenwerte in ml			Titrationenmittel werte in ml	gefundene Barbiturat menge in mg%		gefundene Barbiturat menge in den Gesamt- harmengen in mg
		1.	2.	3.				
10.20	25	0,95	0,90	0,95	0,93	0,25		0,0625
10.55	11,3	0,90	0,90	0,90	0,90	0,24		0,0271
11.30	16	1,10	1,35	1,40	1,28	0,35		0,0560
12.00	7	1,50	1,75	1,60	1,62	0,44		0,0308
12.30	25	1,40	1,40	1,40	1,40	0,38		0,0950
14.25	75	1,55	1,75	1,50	1,60	0,43		0,3225
23.00	265	2,05	2,20	2,20	2,15	0,58		1,5370
10.00	315	1,95	1,70	1,80	1,82	0,49		1,5435

Tab. 13 Verbrauchte Dithionitlösung in ml (1 ml $\hat{=}$ 9,56 μ g Dz) und gefundene Barbituratmenge in mg% aus den Harnproben (Berechnung s.S. 20)

Uhrzeit der Entnahme	Gesamtblutmenge in ml	Titrationswerte in ml		Titrationsmittelwerte in ml	Gefundene Barbituratmenge in mg%
		1.	2.		
10.20	10	1,35	1,40	1,38	0,37
11.20	10	1,35	1,40	1,37	0,37
12.20	10	1,85	1,90	1,87	0,51
15.10	10	1,65	1,80	1,72	0,47

Tab. 14 Verbrauchte Dithizonlösung in ml ($1 \text{ ml} \hat{=} 9,56 \mu \text{g Dz}$) und gefundene Barbituratmenge in mg% aus den Blutproben
(Berechnung s.S. 20)

D. Diskussion und Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Schnellverfahren nach CURRY zur quantitativen Bestimmung der Barbiturate auf seine Brauchbarkeit als Routineverfahren für die Bestimmung von Barbituraten in Blut und Harn untersucht.

Bei diesem Verfahren werden die Barbiturate bei pH 6,95 mit Chloroform aus Blut bzw. Harn extrahiert. Nach Zugabe einer wässrigen Quecksilber(II)bicarbonatlösung bilden sich chloroformlösliche Quecksilberbarbituratverbindungen. Das überschüssige Quecksilberreagenz wird durch mehrmaliges Waschen mit bidest. Wasser entfernt und der Quecksilbergehalt durch Titration mit einer eingestellten Dithizonlösung bestimmt.

Zunächst arbeiteten wir genau entsprechend der Vorschrift von CURRY. Dabei stellten wir fest, dass es schwierig ist, die überschüssigen Quecksilber(II)ionen vollständig zu entfernen. Auch sind mit der Versuchsanordnung Chloroformverluste nicht zu vermeiden. In zahlreichen Untersuchungen ergab sich, dass bei der Titration des Quecksilbers mit Dithizon der Umschlagspunkt mit Hilfe der Ammoniakphase nur ungenau festgestellt werden kann. Ausserdem ist handelsüblicher Ammoniak mit sog. Dithizonmetallen wie Zink, Blei und Kupfer verunreinigt.

Es wurde deshalb versucht, die Versuchsanordnung von CURRY so zu ändern, dass eine reproduzierbare Barbituratbestimmung im Routineverfahren möglich ist: So verwendeten wir ein 25 ml Becherglas um das Absaugen der wässrigen Phase zu erleichtern. Zur vollständigen Entfernung der wässrigen Phase ist ein Messzylinder (hohe Form) notwendig. Da beim Absaugen

der wässrigen Phase immer Chloroformmengen verloren gehen, wird vor dem Titrieren mit Dithizon die zu titrierende Chloroformphase auf eine bestimmte, gleichbleibende Menge eingestellt. Die Verwendung des Ammoniaks zur Erkennung des Umschlagspunktes erwies sich als nicht notwendig, da der Farbumschlag von orange nach blau-grün deutlich festzustellen ist.

Nach der auf Seite 18 beschriebenen Arbeitsweise wurde in Zusatzversuchen mit Luminal, Pentobarbital, Evipan, Prominal und Eunarcon im Bereich von 0,5 — 4 mg% der Barbituratgehalt bestimmt und dabei 80 — 100 % wiedergefunden. Bei Phanodorm dagegen kamen wir nur auf eine Ausbeute von 30 — 55%. Diese geringe Ausbeute kann auf mangelnde Extrahierbarkeit der wässrigen Lösung zurückgeführt werden.

Mit dem angegebenen Verfahren liess sich auch nach therapeutischer Aufnahme von Luminal der Barbituratgehalt in Blut und Harn ermitteln. So wurden im Blut Werte von 0,37 — 0,47 mg% und im Harn von 0,25 — 0,58 mg% gefunden.

Nach den eingehenden Untersuchungen des Barbituratnachweises über seine Quecksilberverbindungen ergab sich, dass mit dem modifizierten Verfahren nach CURRY eine einfache und sichere Bestimmung der Barbiturate in Blut und Harn durchzuführen ist. Für eine derartige Untersuchung sind nur etwa 10 Minuten erforderlich.

E. Literaturnachweis

- 1) BJÖRLING, C.O. Determination of barbituric acid derivatives
BERGGREN, A. as mercury complexes. Acta Chem. Scand.
WILLMANN— 12 No. 5, 1149 — 1150 (1958)
JOHNSON, B.

- 2) BJÖRLING, C.O. Determination of barbituric acid derivatives
BERGGREN, A. as mercury compounds. Acta Chem. Scand.
NYGARD, B. 16, 1481 — 1492 (1962)

- 3) CURRY, A.S. Rapid method of screening for Barbiturates
Brit. Med. J. 11 b, 1040 — 1041 (1963)

- 4) CURRY, A.S. Rapid quantitative barbiturate estimation
Brit. Med. J. 1, 354 — 355 (1964)

- 5) IWANTSCHIEFF, G. Das Dithizon und seine Anwendung in der
Mikro- und Spurenanalyse (1958)

- 6) PFEIL, E. Die Mikrobestimmung der Barbiturate.
GOLDBACH, H.-J. Z. f. physiolog. Chemie 302, 263 — 267
(1955)

- 7) POETHKE, W. Ueber Quecksilberverbindungen der Bar-
FÜRST, W. bitursäurederivate. Pharm. Zentralhalle,
98, Heft 4, 171 — 176 (1959)

- 8) RUPP, E.
MÜLLER, K. Über Medinal-Quecksilberverbindungen
und die Medinal-Identitätsreaktion nach
D.A.B. IV. Arch. d. Pharm. 264, 362 — 365
(1926)
- 9) RUPP, E.
POGGENDORF, A. Über Quecksilberverbindungen der Phenyl-
äthylbarbitursäure. Arch. d. Pharm. 269,
607 — 609 (1931)
- 10) WINTERFELD, K.
BODENDORF, K.
LOTH, P. Vorschläge zur Gestaltung der Prüfungsvor-
schriften einer Reihe von Barbitursäurederi-
vaten, die für einen Nachtrag zum DAB 6 bzw.
für einen DAB 7 in Frage kommen.
Dtsch. Apotheker-Ztg. 95, 324, 552 (1955)
- 11) ZAAR, B.
GRÖNWALL, A. A micromethod for determination of Barbi-
turates in serum as mercury complexes.
Scand. J. Clin. and Lab. Investigation 13,
225 — 230 (1961)

Zum Schluss der Arbeit erlaube ich mir Herrn Prof. Dr. Dr. E. Weinig für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes an seinem Institut meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Diplom-Chemiker Dr. G. Machbert für die zahlreichen Anregungen und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 2.10.1941 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Joseph Trautmann und dessen Ehefrau Maria geb. Sternbacher in München geboren. Von 1948 bis 1959 besuchte ich die Freie Waldorfschule in Heidenheim (Brenz). 1960 trat ich in das Hellenstein-Gymnasium in Heidenheim ein. Meine Reifeprüfung legte ich am 4.3.1965 an der Robert-Blum-Schule in Berlin-Schöneberg ab. Seit dem Sommersemester 1965 studierte ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg Zahnmedizin und bestand am 25. 10.1971 das zahnmedizinische Staatsexamen.

Seit Juli 1969 bin ich verheiratet und habe einen Sohn.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
